

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 612 143 (13) C2

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК

[C12Q 1/06 \(2006.01\)](#)
[C12N 1/02 \(2006.01\)](#)
[G01N 33/532 \(2006.01\)](#)
[B82Y 5/00 \(2011.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 17.03.2017)
Пошлина: учтена за 3 год с 28.07.2017 по 27.07.2018

(21)(22) Заявка: [2015131236](#), 27.07.2015(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.07.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.07.2015

(43) Дата публикации заявки: 30.01.2017 Бюл. № 4

(45) Опубликовано: [02.03.2017](#) Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2538153 C2, 10.01.2015. ZHAN S. et al. "Efficient removal of pathogenic bacteria and viruses by multifunctional amine-modified magnetic nanoparticles", Journal of Hazardous Materials, 2014, v.274, p.115-123. LIN HAILAN et al. "Detection of pathogen Escherichia coli O157:H7 with a wireless magnetoelastic-sensing device amplified by using chitosan-modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles", Sensors and Actuators B, 2010, v.147, p.343-349. BOHARA R. A. et al. "Innovative Developments in Bacterial Detection with Magnetic Nanoparticles", Appl. Biochem. Biotechnol., 18.04.2015, v.176, no.4, DOI 10.1007/s12010-015-1628-9. RU 2397243 C1, 20.08.2010. GU H et al, "Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection", Chem Commun (Camb), 2006, v.9, p.941-949. ГЛАЗЫРИНА Ю.А. "Электрохимический метод определения патогенных микроорганизмов (Salmonella thyphimurium) с использованием магнитных наночастиц". Автореферат диссертации на соиск. уч. степ. к.х.н., Екатеринбург, 2010, с.1-24.

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, К-2, Мира, 19,
УрФУ, центр интеллектуальной

(72) Автор(ы):

Козицина Алиса Николаевна (RU),
Свалова Татьяна Сергеевна (RU),
Глазырина Юлия Александровна (RU),
Матерн Анатолий Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Уральский федеральный
университет имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина" (RU)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ В КАЧЕСТВЕ МЕТКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к электрохимическому иммуноанализу. Предложен способ определения содержания грамотрицательных бактерий в анализируемой среде. В водной среде при температуре 37°C конъюгируют бактерии с магнитными наночастицами Fe_3O_4 , Fe^0 , NiFe_2O_4 или MgFe_2O_4 , модифицированными декстраном. Отделяют несвязавшиеся наночастицы с использованием магнитного поля. Помещают в среду рабочий электрод из золота, платины или графитсодержащих материалов, поверхность которого предварительно модифицируют антителами, специфичными к определяемому штамму бактерий, для образования иммунокомплекса на поверхности электрода в течение 20 мин при температуре 37°C. Промывают электрод буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку и твин-20. Помещают извлеченный из анализируемой среды рабочий электрод в электрохимическую ячейку, содержащую фоновый электролит. Определяют содержание бактерий по величине электрохимического отклика окисления наночастиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности рабочего электрода. Изобретение позволяет увеличить чувствительность и точность анализа, снизить предел обнаружения клеток бактерий до 10 КОЕ/мл, сократить время проведения анализа. 1 з.п. ф-лы, 7 ил., 5 пр.

Изобретение относится к электрохимическому иммуноанализу, а именно к качественному и количественному селективному определению содержания бактерий в пробах различного состава. Изобретение может быть использовано в микробиологии, биотехнологии, медицине, экологии и технологии пищевых производств.

Изобретение создано с целью устранения недостатков широко используемых в настоящее время методов анализа: низкая чувствительность и экспрессность (бактериологический посев), возможность получения ложных результатов (иммуоферментный анализ), высокие требования к оснащению лаборатории и квалификации персонала (ДНК-анализ).

Известен подход [Qi Zhang, Xiaojun Chen, Fulai Tu, Cheng Yao / Ultrasensitive enzyme-free electrochemical immunoassay for free thyroxine based on three dimensionally ordered macroporous chitosan-Au nanoparticles hybrid film // Biosensors and Bioelectronics 59 (2014) 377-383] к определению содержания бактерий *E. coli*, где золотой электрод модифицировали гиалуроновой кислотой и специфичными антителами. Сопротивление электрода изменялось в зависимости от количества бактерий в исследуемой пробе. Основным недостатком такого подхода - высокий риск получения ложных результатов, возникающий вследствие влияния факторов внешней среды на величину сопротивления индикаторного электрода.

Предложен подход [Ana Clarissa dos Santos Pires, Nilda de *Fátima* Ferreira Soares, Luis Henrique Mendes da Silva, Maria do Carmo Hespanhol da Silva, Mauro Vieira De Almeida, Mireille Le Hyaric, *Nélío José* de Andrade, Freitas *Rêmili* Soares, Aparecida Barbosa Mageste, Samira Gama Reis / A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacterial / Sensors and Actuators B 153 (2011) 17-23] к определению бактерий *E. coli* и *S. aureus* фотометрическим методом с использованием в качестве меток органических веществ, изменяющих цвет раствора при взаимодействии с бактериальными метаболитами. Главным недостатком является узкий интервал линейности данного метода.

Описан метод электрохимического иммуноанализа, в качестве метки в котором использовали наночастицы Fe_3O_4 [Brainina, K.Z., Kozitsina, A.N., Glazyrina, Y.A. / Hybrid electrochemical/magnetic assay for Salmonella typhimurium detection // IEEE Sensors Journal Volume 10, Issue 11, 2010, №5483125, pp. 1699-1704]. Аналитическим сигналом в данном варианте иммуноанализа служил максимальный ток электровосстановления ионов Fe^{3+} , полученных после кислотного разложения меченного наночастицами иммунокомплекса. Основным недостатком является необходимость проведения длительного и многостадийного кислотного разложения иммунокомплекса.

Известен способ определения содержания бактерий *E. coli* [Патент РФ №2542487. Козицина А.Н., Малышева Н.Н., Глазырина Ю.А., Матери А.И. «Способ определения содержания грамотрицательных патогенных бактерий в анализируемой среде». Дата

приоритета 15.07.2013], где в качестве метки использовали наночастицы магнетита, покрытые электроактивными органическими соединениями, в частности полипирролом, хинолинмодифицированным поливинилбензилхлоридом, ферроценмодифицированным оксидом кремния. Максимальный ток окисления/восстановления электроактивного покрытия служил аналитическим сигналом. Существенным недостатком предложенного метода является сложная технология получения нанокомпозитов и трудности при их длительном хранении.

Наиболее близким техническим решением, выбранным в качестве прототипа, служит способ определения содержания патогенных микроорганизмов в различных объектах, включающий конъюгирование микроорганизмов с сигналообразующей меткой, магнитную сепарацию с последующим концентрированием конъюгатов и определением наличия и концентрации микроорганизмов с помощью введенной метки. В качестве сигналообразующей метки выступают электрохимически активные магнитные наночастицы, аналитический сигнал от которых получают напрямую в результате их разряда-ионизации на поверхности рабочего электрода. Концентрирование метки осуществляют путем образования иммунного комплекса «антитело-меченная магнитными наночастицами бактерия» на поверхности рабочего электрода. Величина электрохимического отклика от магнитной нанометки пропорциональна содержанию бактерий в исследуемой пробе [Патент РФ №2538153. Козицына А.Н., Митрофанова (Свалова) Т.С., Матери А.И. «Электрохимический способ иммуноанализа для определения микроорганизмов». Дата приоритета 22.03.2013 г.]. К недостаткам предложенного способа можно отнести невысокий предел обнаружения (100 КОЕ/мл) и недостаточную точность определения малых количеств микроорганизмов, а также невозможность обнаружения в пробах грамположительных бактерий.

Предлагаемое техническое решение направлено на повышение чувствительности и точности определения, расширение круга определяемых бактерий, а также на уменьшение временных затрат на проведение процедуры иммуноанализа.

Предлагаемый способ электрохимического иммуноанализа включает в себя инкубацию бактерий с модифицированными магнитными наночастицами, магнитную сепарацию свободных наночастиц, образование иммунного комплекса на поверхности электрода и детектирование электрохимического отклика от магнитной нанометки, интенсивность которого пропорциональна содержанию бактерий в исследуемой пробе. Схема проведения процедуры иммуноанализа приведена в приложении 1. Магнитные наночастицы модифицируют декстраном [V. Zavisova, M. Koneracka, J. Kovac, M. Kubovcikova, I. Antal, P. Kopcansky, M. Bednarikova, M. Muckova / The cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different modifications evaluated in vitro // Journal of Magnetism and Magnetic Materials 380 (2015) 85-89] с целью облегчения проникновения их в клеточную мембрану и реализации более равномерного распределения наночастиц на поверхности грамотрицательной бактериальной клетки. Также модификация поверхности магнитных наночастиц позволяет сократить время проведения процедуры иммуноанализа вследствие облегчения процессов клеточного эндоцитоза в случае поглощения модифицированных магнитных наночастиц и уменьшить поверхностную энергию наночастиц и, следовательно, предотвратить их агрегацию, в результате чего размер частиц не изменяется в течение всего эксперимента. Это позволяет существенно улучшить чувствительность и точность, а получение прямого аналитического сигнала непосредственно от магнитной нанометки, включенной в иммунный комплекс на поверхности рабочего электрода, приводит к сокращению времени проведения анализа.

Таким образом, согласно предложенному способу локализацию и удерживание магнитных наночастиц на поверхности микробной клетки осуществляют за счет ферментативных реакций в клеточной мембране грамотрицательных бактерий с (био)органическими соединениями, после чего на поверхности рабочего электрода формируют меченный наночастицами иммунный комплекс и детектируют электрохимический сигнал. Это позволяет снизить предел обнаружения (до 10 КОЕ/мл), сократить время проведения процедуры иммуноанализа, уменьшить материало- и трудозатраты и реализовать высокое качество анализа проб, содержащих бактерии разных штаммов. Все это в конечном итоге приведет к снижению себестоимости анализа.

На фиг. 1 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в модельных растворах, содержащих (а, 1-2) и не содержащих (б, 1-2) бактерии *Salmonella thyphimurium*: 1 - вольтамперограмма фоновых электролитов; 2 - вольтамперограмма пробы.

На фиг. 2 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 3-4) и не содержащих (б, 3-4) бактерии *Salmonella*

thyphimurium: 3 - вольтамперограмма фонового электролита; 4 - вольтамперограмма пробы.

На фиг. 3 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 3-4) и не содержащих (б, 3-4) бактерии *Escherichia coli*: 5 - вольтамперограмма фонового электролита; 6 - вольтамперограмма пробы.

На фиг. 4 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 7-8) и не содержащих (б, 7-8) бактерии *Salmonella infantis*: 7 - вольтамперограмма фонового электролита; 8 - вольтамперограмма пробы.

На фиг. 5 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 9-10) и не содержащих (б, 9-10) бактерии *Escherichia coli*: 9 - вольтамперограмма фонового электролита; 10 - вольтамперограмма пробы.

На фиг. 6 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 11-12) и не содержащих (б, 11-12) бактерии *Staphylococcus Aureus*: 11 - вольтамперограмма фонового электролита; 12 - вольтамперограмма пробы.

На фиг. 7 представлены циклические вольтамперограммы, зарегистрированные в пробах, содержащих (а, 13-14) и не содержащих (б, 13-14) бактерии *Salmonella thyphimurium*.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

Вытяжку из анализируемой пробы (проба воздуха) инкубируют с наночастицами Fe_3O_4 , модифицированными декстраном, в течение 20 минут при температуре 37°C . После инкубации свободные наночастицы отделяют с использованием магнитного поля в течение 5 минут. Далее в анализируемую среду помещают платиновый электрод, модифицированный антителами против *Salmonella thyphimurium*, и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C . Для ускорения процесса доставки меченых бактерий к поверхности рабочего электрода используют магнитное поле (напряженностью $31.83 \cdot 10^3$ А/м). Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор LiClO_4 в ацетонитриле. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления предварительно восстановленного магнетита, локализованного в иммунокомплексе на поверхности платинового электрода. Для проведения контрольного (холостого) эксперимента используют раствор, не содержащий компонентов бактериальной природы (физиологический раствор). В анализируемой пробе обнаружено 9 КОЕ/мл.

Пример 2

Пробу природной воды инкубируют с наночастицами Fe^0 , модифицированными декстраном, в течение 20 минут при температуре 37°C . После инкубации свободные наночастицы отделяют с использованием магнитного поля в течение 5 минут. Далее в анализируемую среду помещают графитсодержащий электрод, модифицированный антителами против *Escherichia coli*, и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C . Для ускорения процесса доставки меченых бактерий к поверхности рабочего электрода используют магнитное поле (напряженностью $31.83 \cdot 10^3$ А/м). Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор LiClO_4 в диметилформамиде. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления предварительно восстановленного магнетита, локализованного в иммунокомплексе на поверхности графитсодержащего электрода. Для проведения контрольного (холостого) эксперимента используют раствор, не содержащий компонентов бактериальной природы (физиологический раствор). В анализируемой пробе воды обнаружено 10^3 КОЕ/мл.

Пример 3

Пробу природной воды инкубируют с наночастицами NiFe_2O_4 , модифицированными декстраном, в течение 20 минут при температуре 37°C . После инкубации свободные наночастицы отделяют с использованием магнитного поля в течение 5 минут. Далее в анализируемую среду помещают золотой электрод, модифицированный антителами против *Salmonella infantis*, и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C . Для ускорения процесса доставки меченых бактерий к поверхности рабочего электрода используют магнитное поле (напряженностью

31.83·10³ А/м). Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор KNO₃ в смеси вода/этиловый спирт (в соотношении 3/1). В качестве аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления предварительно восстановленного магнетита, локализованного в иммунокомплексе на поверхности золотого электрода. Для проведения контрольного (холостого) эксперимента используют раствор, не содержащий компонентов бактериальной природы (физиологический раствор). В анализируемой пробе воды обнаружено 10³ КОЕ/мл.

Пример 4

Вытяжку из анализируемой пробы (фекалии инфицированных животных) инкубируют с наночастицами MgFe₂O₄, модифицированными декстраном, в течение 20 минут при температуре 37°C. После инкубации свободные наночастицы отделяют с использованием магнитного поля в течение 5 минут. Далее в анализируемую среду помещают графитсодержащий электрод, модифицированный антителами против *Escherichia coli*, и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C. Для ускорения процесса доставки меченых бактерий к поверхности рабочего электрода используют магнитное поле (напряженностью 31.83·10³ А/м). Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор NEt₄BF₄ в диметилсульфоксиде. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления предварительно восстановленного магнетита, локализованного в иммунокомплексе на поверхности графитсодержащего электрода. Для проведения контрольного (холостого) эксперимента используют раствор, не содержащий компонентов бактериальной природы (физиологический раствор). В анализируемой пробе обнаружено 5·10⁵ КОЕ/мл.

Пример 5

Вытяжку из анализируемой пробы (фекалии инфицированных животных) инкубируют с наночастицами Fe₃O₄, модифицированными декстраном, в течение 20 минут при температуре 37°C. После инкубации свободные наночастицы отделяют с использованием магнитного поля в течение 5 минут. Далее в анализируемую среду помещают графитсодержащий электрод, модифицированный антителами против *Salmonella thyphimurium*, и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37°C. Для ускорения процесса доставки меченых бактерий к поверхности рабочего электрода используют магнитное поле (напряженностью 31.83·10³ А/м). Затем электрод промывают буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку (НЛС) и твин-20. Извлеченный из анализируемого раствора электрод помещают в электрохимическую ячейку. В качестве фонового электролита используют раствор Na₂HPO₄ в диметилсульфоксиде. В качестве аналитического сигнала используют электрохимический отклик окисления предварительно восстановленного магнетита, локализованного в иммунокомплексе на поверхности графитсодержащего электрода. Для проведения контрольного (холостого) эксперимента используют раствор, не содержащий компонентов бактериальной природы (физиологический раствор). В анализируемой пробе обнаружено 60 КОЕ/мл.

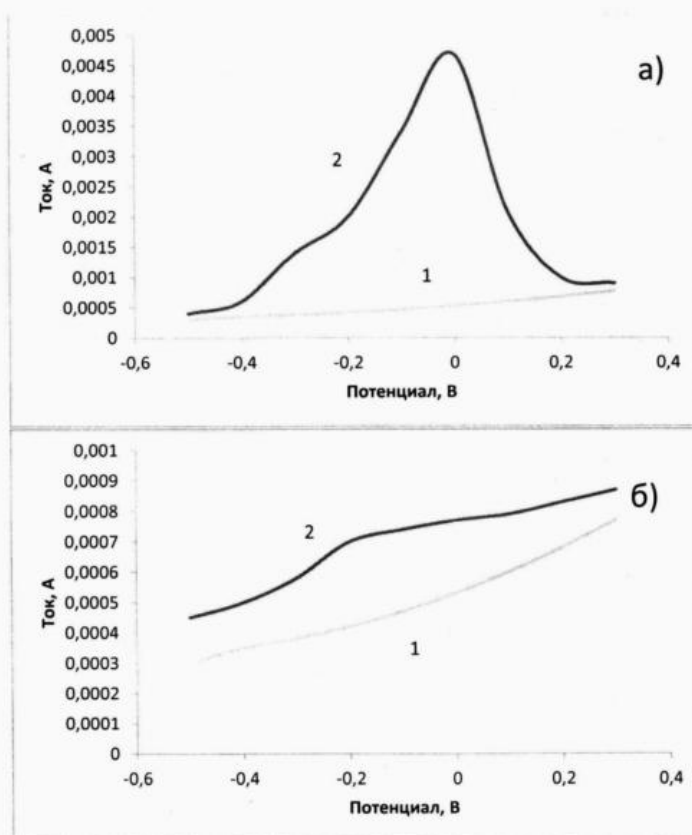
Формула изобретения

1. Способ определения содержания грамотрицательных бактерий в анализируемой среде, характеризующийся конъюгированием бактерий с электрохимической меткой, в качестве которой используют магнитные наночастицы, осуществляемым в водной среде при температуре 37°C, отделением несвязавшихся наночастиц с использованием магнитного поля, помещением в среду рабочего электрода, изготовленного из золота, платины или графитсодержащих материалов, поверхность которого предварительно модифицируют антителами, специфичными к определяемому штамму бактерий, образованием иммунокомплекса на поверхности электрода в течение 20 мин при температуре 37°C с использованием магнитного поля, промыванием электрода буферным раствором, содержащим нормальную лошадиную сыворотку и твин-20, помещением извлеченного из анализируемой среды рабочего электрода в электрохимическую ячейку, содержащую фоновый электролит, и определением содержания микроорганизмов по величине аналитического сигнала, в

качестве которого используют электрохимический отклик окисления наночастиц, локализованных в иммунокомплексе на поверхности рабочего электрода, отличающийся тем, что в качестве магнитных наночастиц используют Fe_3O_4 , Fe^0 , NiFe_2O_4 , MgFe_2O_4 , модифицированные декстраном.

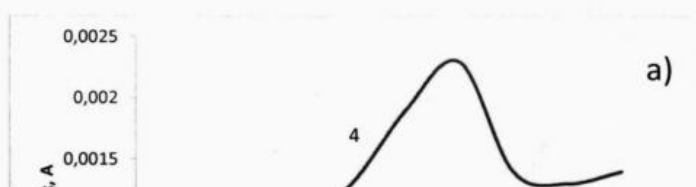
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве фоновых электролитов используют растворы LiClO_4 , KNO_3 , NEt_4BF_4 или Na_2HPO_4 в ацетонитриле, диметилформамиде, диметилсульфоксиде, воде и смеси вода/этиловый спирт.

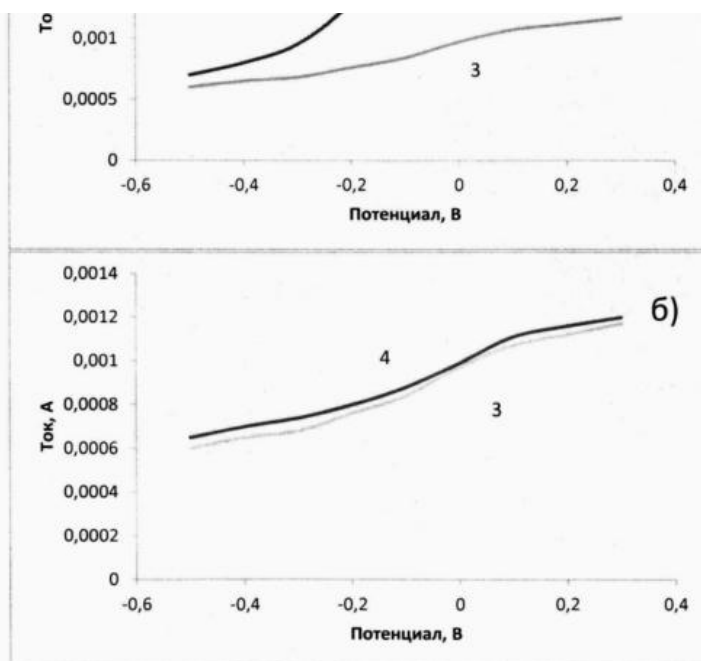
Способ определения содержания бактерий с
использованием в качестве метки
модифицированных магнитных наночастиц



Фиг. 1

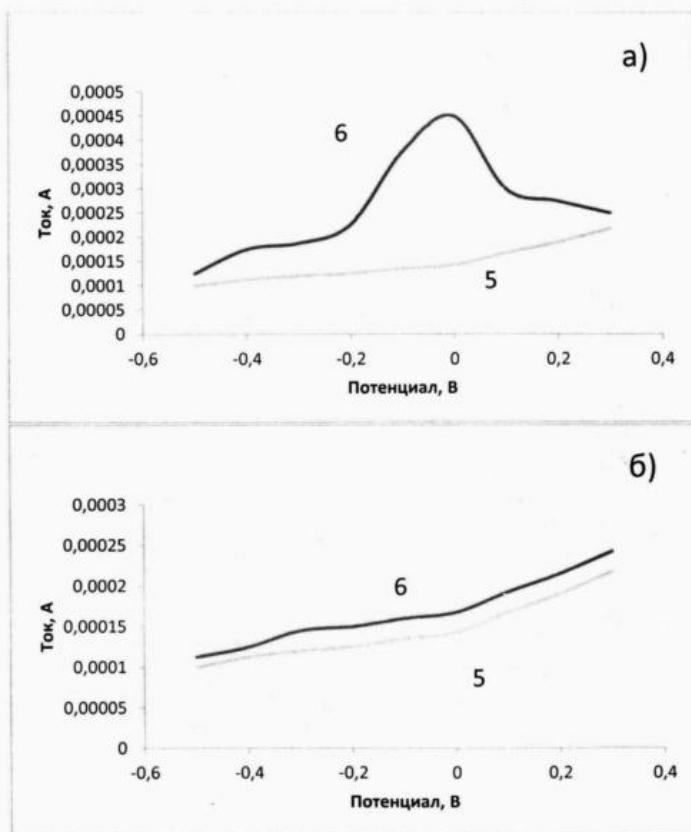
Способ определения содержания бактерий с
использованием в качестве метки
модифицированных магнитных наночастиц





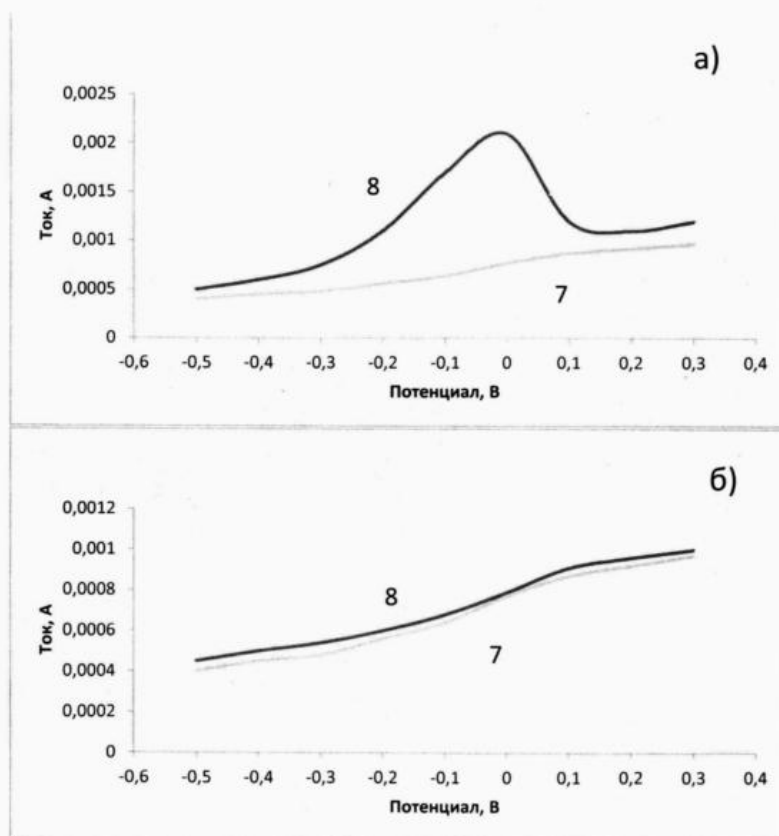
Фиг. 2

Способ определения содержания бактерий с
использованием в качестве метки
модифицированных магнитных наночастиц



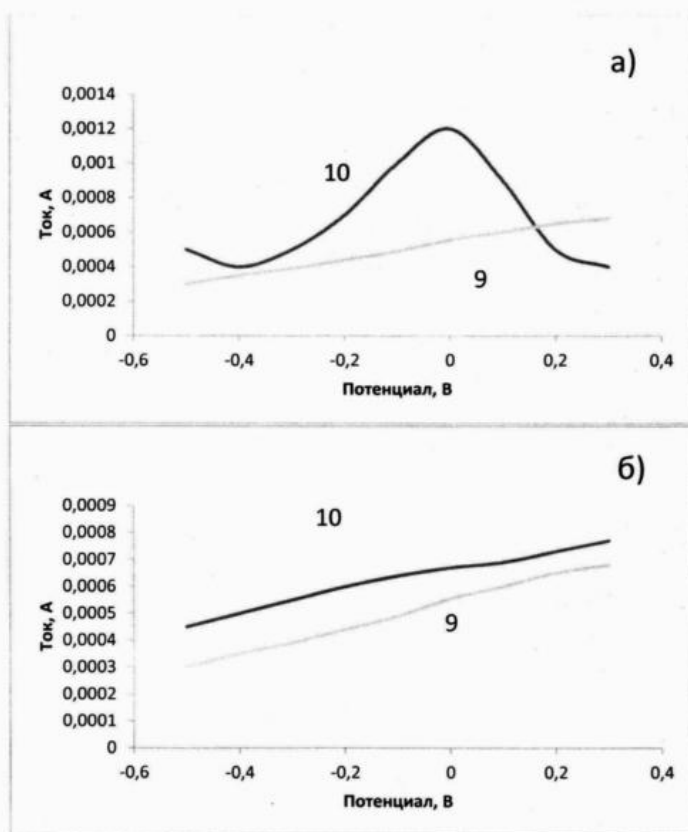
Фиг. 3

Способ определения содержания бактерий с
использованием в качестве метки
модифицированных магнитных наночастиц



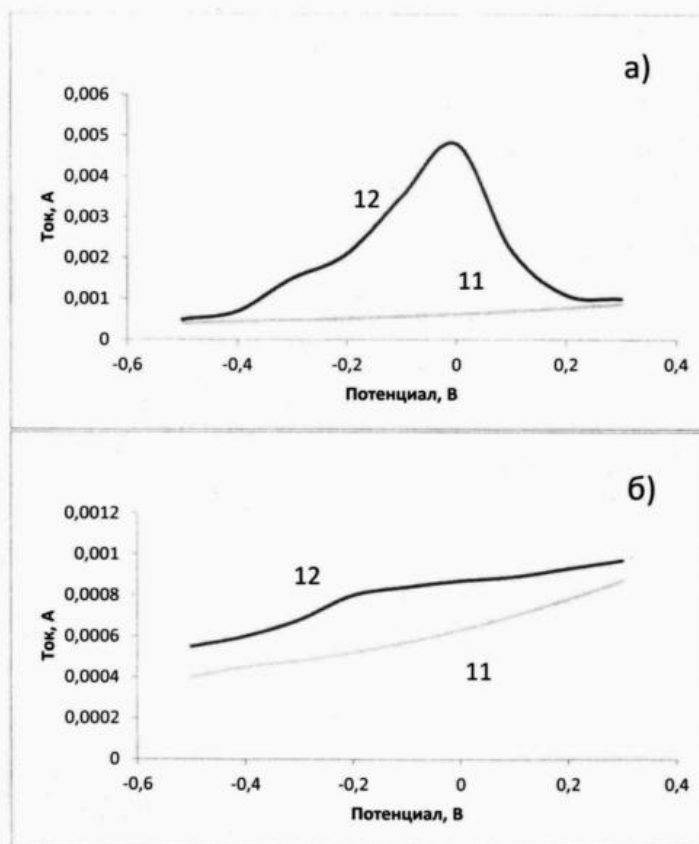
Фиг. 4

Способ определения содержания бактерий с
использованием в качестве метки
модифицированных магнитных наночастиц



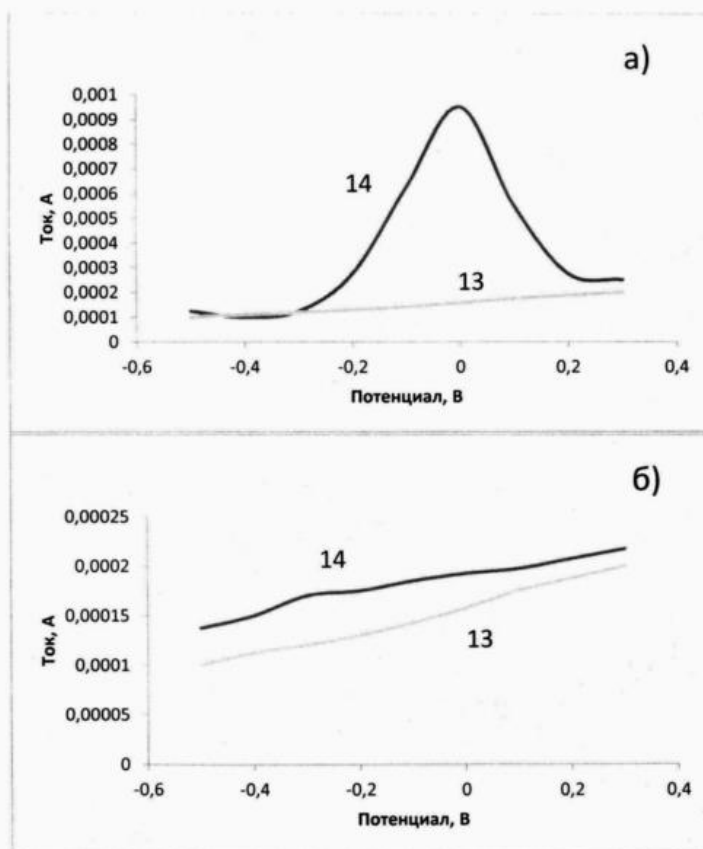
Фиг. 5

Способ определения содержания бактерий с
использованием в качестве метки
модифицированных магнитных наночастиц



Фиг. 6

Способ определения содержания бактерий с
использованием в качестве метки
модифицированных магнитных наночастиц



Фиг. 7

Приложение 1

Способ определения содержания бактерий с использованием в качестве метки модифицированных магнитных наночастиц

